Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. D. H e n s c h l e r

PROTEINNEUBILDUNG IN VIVO NACH SCHWEFELKOHLENSTOFF-INHALATION UND DIE VERTEILUNG VON $^{14}CS_2$ IN LEBERZELLFRAKTIONEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Peter Eichhorn
aus
Bielitz/Oberschl.

Würzburg, 9. Mai 1972

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. D. H e n s c h l e r

PROTEINNEUBILDUNG IN VIVO NACH SCHWEFELKOHLENSTOFF-INHALATION UND DIE VERTEILUNG VON $^{14}CS_2$ IN LEBERZELLFRAKTIONEN

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

verfaßt und der Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der zahnmedizinischen Doktorwürde

vorgelegt von
Peter Eichhorn
aus
Bielitz/Oberschl.

Würzburg, 9. Mai 1972

Referent: Prof. Dr. D. Henschler

Korreferent: Priv.-Doz. Dr.Dr. K. Hempel

Dekan: Prof. Dr. K.-H. Weis

Tag der mündlichen Prüfung: 15.6.1972

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Universität Würzburg

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	E i n l e i t u n g	1
1.1.	Toxikologische Bedeutung des Schwefelkohlenstoffs	1
1.2.	Hemmung mikrosomaler mischfunktioneller Oxygenasen durch Schwefelkohlenstoff	1
1.3.	Schwefelkohlenstoff und Proteine	3
1.4.	Resorption, Verteilung und Elimination von Schwefelkohlenstoff	5
2.	P r o b l e m s t e l l u n g	6
3.	M e t h o d e n	7
3.1.	Tiere und Tierhaltung	7
3.2.	Tierversuche	7
3.2.1.	mit ^{3}H-Phenylalanin	7
3.2.1.1.	Exponierung der Versuchstiere in Schwefelkohlenstoff	7
3.2.1.2.	Einbau von ^{3}H-Phenylalanin in vivo	8
3.2.2.	Applikation und Einwirkung von radioaktivem Schwefelkohlenstoff ($^{14}CS_2$)	9
3.3.	Biochemisch-analytische Methoden	10
3.3.1.	Leberzellfraktionierung	10
3.3.2.	Isolierung der säureunlöslichen Gewebsbestandteile	10
3.3.3.	Proteinbestimmung	11
3.4.	Markierte Verbindungen	12
3.4.1.	Markierte Verbindungen	12
	a) L-Phenylalanin	12
	b) Radioaktiver Schwefelkohlenstoff	12
3.4.2.	Prüfung der radiochemischen Reinheit	12
3.4.2.1.	^{3}H-Phenylalanin	12
3.4.2.2.	$^{14}CS_2$	13
3.4.2.2.1.	Vorbemerkung zur Methode	14
3.4.2.2.2.	Arbeitsvorschrift zur Synthese von ^{14}C-Diphenylthioharnstoff	14
3.4.3.	Herstellung der $^{14}CS_2$-Injektionslösung	15
3.4.4.	Radioaktivitäts-Messungen mit dem Flüssigkeitsscintillations-Zähler	15

		Seite
3.4.4.1.	Bereitung der Proben	15
3.4.4.1.1.	durch Kolbenverbrennung	15
3.4.4.1.2.	Lösen feuchter Organproben in Soluene(R)	16
3.4.4.1.2.1.	Versuche mit ^{3}H-Phenylalanin	16
3.4.4.1.2.2.	Versuche mit $^{14}CS_2$	16
3.4.4.1.3.	Scintillator-Lösungen	17
3.4.4.1.3.1.	POPOP-Medium	17
3.4.4.1.3.2.	Sperrmedium	17
3.4.4.1.4.	Aktivitäts-Messungen mit dem Flüssigkeits-scintillations-Zähler	17
3.4.4.1.4.1.	Prinzip der Messung	17
3.4.4.1.4.2.	Messung der Proben	17
3.4.4.1.4.3.	Bestimmung der Zählausbeute durch externe Standardisierung	18
3.4.4.1.4.4.	Bestimmung der Zerfälle pro min einer Probe	21
3.4.4.1.4.5.	Auswertung	21
3.5.	Statistische Auswertung	21
4.	E r g e b n i s s e	23
4.1.	Verteilung und Elimination von ^{14}C-markiertem Schwefelkohlenstoff	23
4.2.	Einbau von ^{3}H-markiertem Phenylalanin in Leber und Serum	24
5.	D i s k u s s i o n	27
5.1.	$^{14}CS_2$ in Leberzellfraktionen und Serum	27
5.2.	^{3}H-Phenylalanin-Einbau in Rattenleber-Mikrosomen	28
5.3.	Ausblicke	31
6.	A n h a n g	33
6.1.	Linearitätsbereich für Scintillations-messungen	33
6.2.	Chemolumineszenz von Meßproben, die Instagel und Soluene(R) enthalten	34
7.	Z u s a m m e n f a s s u n g	35
8.	L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s	36

1. Einleitung

1.1. Toxikologische Bedeutung des Schwefelkohlenstoffs

Schwefelkohlenstoff (CS_2) ist eine klare, charakteristisch riechende, in Wasser wenig lösliche Flüssigkeit; er ist bereits bei Zimmertemperatur flüchtig (Siedepunkt 46,3° C), seine Dämpfe sind leicht entzündlich.

CS_2 ist ein universales Lösungsmittel für organische Verbindungen und einige elementar vorliegende Stoffe, das in der Industrie und im Gewerbe in steigendem Maße, vor allem bei der Kunstfaserherstellung und bei der Kautschukverarbeitung, verwendet wird.

Der Schwefelkohlenstoff ist ein potentiell gefährlicher Arbeitsstoff. Er ruft akute, subakute und chronische Vergiftungen hervor (VIGLIANI 1961, MOESCHLIN 1964, WIRTH, HECHT, GLOXHUBER 1971, BROWNING 1965); häufigster Anlaß ist seine Inhalation. Eine perorale Einverleibung kommt selten vor. CS_2 kann aber auch durch die Haut permeieren. Akut aufgenommener CS_2 kann eine Narkose verursachen. Eine chronische Einwirkung ist von Störungen im peripheren und zentralen Nervensystem gefolgt; ebenso treten Gefäßveränderungen ("vaskuläres sulfocarbotoxisches Spätsyndrom" nach v. RECHENBERG (1957)) auf. Selten wird die Leber- oder Nierenfunktion gestört.

Am Arbeitsplatz gelten in der BRD und einigen westlichen Ländern Konzentrationen bis 20 ppm als unbedenklich (MAK).

1.2. Hemmung mikrosomaler mischfunktioneller Oxygenasen durch Schwefelkohlenstoff

Schwefelkohlenstoff hemmt in vivo sowie in vitro die Aktivität verschiedener Hydrolasen und Oxygenasen (Übersicht bei FREUNDT 1972). Zu letzteren zählen auch die Fremdstoffe abbauenden Leberenzyme. Die Katalyse dieser mischfunktionellen Oxydasen wird, wie FREUNDT und DREHER (1969) sowie FREUNDT und KUTTNER (1969) bei der Ratte zeigten, nach CS_2-Inhalation eingeschränkt. Dieses Verhalten beschrieben die Autoren für die Seitenkettenoxydation (Hexobarbital-Abbau), die aliphatische C-Hydroxylierung (Trichloräthylen-Abbau), die quasi-aromatische C-Hydroxylierung (Phenazon-Abbau), die aromatische C-Hydroxylierung (Acetanilid-Abbau), die o-Dealkylierung (Phenazetin-Abbau), die N-Demethylierung (Aminophenazon-Abbau). Diese metabolischen Schritte werden nach Einwirkung von

20 ppm CS_2/8 Std über mindestens 6 Stunden signifikant gehemmt. Der Effekt baut sich kontinuierlich auf und verschwindet nach kurzer Zeit mit exponentiellem Verlauf; er ist voll reversibel. Dieses Verhalten wurde auch beim Menschen am Beispiel des Aminophenazon-Abbaus bestätigt (MACK und FREUNDT 1971). Bereits 10 ppm/ 6 Std verursachen eine signifikante kurzdauernde Verminderung der Bildung des Aminophenazon-Abbauproduktes 4-Amino-antipyrin. Sowohl bei der Ratte, als auch beim Menschen steigern höhere CS_2-Dosen den genannten Hemmeffekt.

Demgegenüber werden Konjugationsreaktionen, die nicht an mikrosomale Enzyme gebunden sind, wie die quasi-aromatische N-Acetylierung (von 4-Aminoantipyrin zu 4-Acetyl-Aminoantipyrin), die aromatische N-Acetylierung (von Sulfisomidin zu Acetylsulfisomidin), wie auch die Glucuronidierung (von 4-Hydroxyphenazon zu 4-Hydroxyphenazonglucuronid) durch niedere CS_2-Konzentrationen bei der Ratte nicht beeinträchtigt. Die Hydrolyse, studiert am Beispiel der Procainspaltung, wird bei Mäusen höchstens nach Vorbehandlung in mittleren CS_2-Dosen (400 ppm/8 Std) gering vermindert (FREUNDT und DREHER 1969).

Bei gleicher CS_2-Vorbehandlung sind die klinischen konventionellen Leberfunktionstests nicht verändert (FREUNDT und DREHER 1969). Dieses Verhalten weist darauf hin, daß der aufgefundene Inhibitoreffekt als eine selektive, reversible Störung des Enzymsystems aufzufassen ist und nicht auf eine allgemeine Zellschädigung zurückzuführen ist.

Zur Erklärung des von obigen Autoren beschriebenen Hemmeffektes werden einige, an Ratten erarbeitete Daten vorgelegt (KROMER und FREUNDT 1970, FREUNDT und SCHNAPP 1970, FREUNDT und SCHAUENBURG 1971, HENSCHLER und FREUNDT 1971). Der Schwefelkohlenstoff verschwindet aus dem Blut mit einer Halbwertzeit von 30 Minuten, aus den großen Körperorganen mit einer solchen von 1 Stunde. Der Konzentrationsabfall verläuft exponentiell. Diese Charakteristik gilt für den freien CS_2 wie für den durch Säure abspaltbaren, gebundenen CS_2. Der Rückgang der Inhibitorwirkung auf mischfunktionelle Oxydasen erfolgt ungefähr gleich schnell. Es liegt eine starke, jedoch noch reversible Bindung des Inhibitors am oxydierenden mischfunktionellen Enzymsystem vor; mit hoher Wahrscheinlichkeit wird ein ESI-Komplex[+] gebildet. Der Bestand an mikrosomalem Cytochrom

[+] Enzym-Substrat-Inhibitor-Komplex

P-450 bleibt normal. Mit dem Rückgang der genannten Hemmwirkung korreliert eng die Regeneration des durch Schwefelkohlenstoffeinwirkung veränderten mikrosomalen Lipidmusters. Dosisabhängig bewirkt nämlich inhalierter CS_2 eine Vermehrung der Gesamtlipide in isolierten Rattenlebermikrosomen, wobei Phospholipoide wie auch Neutrallipide vermehrt werden. Diesem Verhalten ist eine grundlegende Bedeutung beizumessen. Als Folge der diffusen Veränderung lipidhaltiger Mikrosomenmembranen wäre nämlich eine Änderung multipler aktivitätsregulierender Faktoren im elektronenübertragenden, mikrosomalen Enzymsystem denkbar. Dieser Zustandswechsel könnte zumindest bei der Auslösung des beschriebenen CS_2-Effektes mitbeteiligt sein.

Teilweise qualitativ gleich wie inhalierter Schwefelkohlenstoff beeinflußt peroral zugeführter CS_2 mikrosomale Leberenzyme. BOND und DE MATTEIS (1969) beobachteten bei Ratten nach einer einmaligen peroralen Dosis von 1 ml (!) CS_2/kg in Erdnußöl gelöst eine starke Abnahme der "Anilinhydroxylase- und der Nitroanisoldemethylase"-Aktivität, gleichzeitig sank der mikrosomale Cytochrom P-450-Gehalt. Eine zusätzliche Gabe von Phenobarbital bewirkt, wie BOND et al. 1969 zeigten, eine Leberzellnekrose. Dieser eigenartige Effekt konnte von den Autoren jedoch nicht erklärt werden.

1.3. Schwefelkohlenstoff und Proteine

Der Einfluß von CS_2 auf Proteine wurde von BOBSIEN (1954), CHERVENKA und WILCOX (1956), MÁDLO und SOUČEK (1956), SOUČEK und MÁDLO (1953, 1954, 1955, 1956), SOUČEK et al. (1957), VIGLIANI und PERNIS (1955) untersucht. Die Autoren fanden, daß sich der CS_2 mit freien Aminogruppen von Aminosäuren bzw. Proteinen verbindet, wobei eine -N-CS-SH-Gruppierung entsteht. Eine ähnliche Bindung zwischen CS_2 und Peptiden bzw. Enzymen führt zu einer Umwandlung der basischen $-NH_2$-Gruppe in eine saure -SH-Gruppe. Diese könnte für die von einigen Fermenten bekannte Aktivitätshemmung verantwortlich sein.

Eine Reaktion des CS_2 mit NH_2-Gruppen spielt mit hoher Wahrscheinlichkeit auch beim Metabolismus des CS_2 im Organismus eine Rolle. Die obengenannten Autoren und auch GEIGER (1952), LEONIS (1948), YOSHIDA (1955), ZAHRADNÍK (1956 a, b, 1959) folgerten, daß es sich dabei um Verbindungen vom Typ der Dithiocarbamate handelt.

Ein ähnlicher Vorgang könnte auch mit Stoffen zustande kommen, die ein basisches Stickstoff-Atom enthalten (SOUČEK 1957). LEVY (1950) ließ CS_2 mit einigen Dipeptiden reagieren, wobei Produkte mit Thiazolidinringen entstanden. Hiernach wäre denkbar, daß auch im Stoffwechsel aus den Dithiocarbamaten in einem zweiten Schritt durch Ringschluß Thiazolidone (SOUČEK und MÁDLO 1954) entstehen. PEGAL et al. (1971 a, b) isolierten aus dem Harn von Arbeitern einer Glanzstoffabrik 2-Mercapto-thiazolidon-5 und Thiocarbamid.

Schwefelkohlenstoff hemmt in vivo und in vitro zahlreiche Fermente (Übersicht bei FREUNDT 1972). Der Mechanismus dieser Wirkung ist unklar. SCHEEL et al. (1960) und SCHEEL (1965) führten die Hemmung einiger metallabhängiger Enzyme auf eine Chelatbildung der aus dem CS_2 im Organismus aufgebauten Dithiocarbamatgruppen mit Metallionen, hauptsächlich Kupfer, Magnesium und Zink, zurück.

CS_2 ändert die Proteinzusammensetzung. PICOLLI und ROZERA (1958) fanden bei 30 Arbeitern, die CS_2 exponiert waren, einen Anstieg der Albumine, der α_1- und α_2-Globuline im Serum; die β- und γ-Globuline blieben normal. Die α-Fraktionen der Lipoproteine waren in 50 % der Fälle erhöht, die β-Fraktionen nur vereinzelt. Demgegenüber stellte NESSWETHA (1956) bei 134 Personen, die wechselnden CS_2-Konzentrationen ab 6,5 ppm ausgesetzt waren, eine deutliche Zunahme der β-Globuline bei geringer Vermehrung der α_2-Globuline fest. Eine 5-stündige Exponierung in 225 ppm CS_2 führte nach VIGLIANI und PERNIS (1955) bei gesunden Versuchspersonen unter gleichzeitiger Verabreichung einer fettreichen Mahlzeit zu einem Anstieg der Lipoproteine, insbesondere der β-Fraktion, im Serum. Eine Verminderung der Serumalbumine und -globuline fand LYSINA (1967) bei einigen Arbeitern, die in Schwefelkohlenstoff-verarbeitenden Fabriken seit 2 - 5 Jahren tätig waren. Ähnliches stellten TOYAMA und SAKURAI (1967) bei der Belegschaft einiger Viskosespinnereien fest: Nach Einwirkung von ungefähr 50 ppm CS_2 am Arbeitsplatz war der Albumin-Globulinquotient erniedrigt.

Inhalierter Schwefelkohlenstoff ruft bei Ratten eine geringe Vermehrung (rund 15 %) der Gesamtproteine in der Leberzelle hervor (KÜRZINGER und FREUNDT 1969). Diese Veränderung ist nicht dosisabhängig, sie tritt nach 20 ppm/8 Std. gleich stark wie nach 400 ppm/8 Std. auf; sie ist rasch reversibel. Gleichzeitig wird von der CS_2-Dosis unabhängig das mikrosomale Protein um maximal 30 % vermehrt (KRÖMER und FREUNDT 1970).

1.4. Resorption, Verteilung und Elimination von Schwefelkohlenstoff

Über die Pharmakokinetik von CS_2 liegen eine Reihe von Beobachtungen vor. Hier sollen nur die Daten referiert werden, die an der Ratte nach Inhalation erhoben wurden (KREJČÍ und MÁDLO 1951, FREUNDT und SCHNAPP 1970).

Bei Exposition in 400 ppm CS_2 ist im Blut nach 1 Std., in Leber, Niere und Gehirn zwischen 1 und 8 Std. Sättigung mit freiem CS_2 erreicht. Die Aufsättigung mit dem "säurelöslichen" CS_2-Anteil (BÜSING und BOHLÄNDER 1952; BARTONÍČEK 1958) - d.i. wahrscheinlich an Protein gebundener CS_2 - erfolgt in Niere und Gehirn gleich schnell, im Blut und in der Leber jedoch langsamer. Der freie CS_2 verteilt sich in Blut, Leber, Niere und Gehirn im Verhältnis 3:2:2:1, der säurelösliche CS_2-Anteil wie 3:2:1:1. Für Gehirn, Rückenmark und periphere Nerven besteht nach Inhalation ein Verteilungsverhältnis von 1:2:4,5 (KREJČÍ und MÁDLO 1951). Nach Exposition in 400, 100 bzw. 20 ppm CS_2/8 Std. wird der freie CS_2 mit einer Halbwertzeit von 35 min aus dem Blut, mit einer solchen von 1 Std. aus der Leber und der Niere, aus dem Gehirn mit 1 1/4 Std. exponentiell eliminiert. Der säurelösliche CS_2-Anteil verweilt fast doppelt so lange in den genannten Organen. CS_2 verbleibt im Nervengewebe doppelt so lang und im Blut nur halb so lang wie im Fettgewebe (KREJČÍ und MÁDLO 1951). Der Gehalt an anorganischem Sulfat im Rattenharn ist selbst nach Exponierung in 400 ppm/8 Std. nicht erhöht.

2. Problemstellung

Inhalatorisch aufgenommener CS_2 hemmt schon in geringer Dosis bei kleinen Laboratoriumstieren den oxydativen Abbau von Fremdstoffen (FREUNDT und DREHER 1969, FREUNDT und KUTTNER 1969). Dieses auch beim Menschen (MACK und FREUNDT 1971) bekannt gewordene Verhalten wird auf eine Verminderung der Aktivität mischfunktioneller Leberoxydasen zurückgeführt. Der Mechanismus ist weitgehend ungeklärt. Eigenartigerweise tritt gleichzeitig eine von der CS_2-Dosis unabhängige Vermehrung des Leberproteins ($\sim$ 15 %) (KÜRZINGER und FREUNDT 1969) und des mikrosomalen Proteins ($\sim$ 30 %) (KROMER und FREUNDT 1970) auf.

Diese unverhoffte Beobachtung war uns Anlaß, den Einbau einer radioaktiv markierten Aminosäure (^{3}H-Phenylalanin) in Rattenlebermikrosomen zu untersuchen. Hierbei sollte die Inkorporation in Abhängigkeit von verschiedenen CS_2-Konzentrationen (20 bis 400 ppm) nach achtstündiger Einwirkung in vivo geprüft werden. Auch sollte eruiert werden, ob eine eventuelle Einbauänderung reversibel ist. Für diese Untersuchungen soll eine praktikable Methode eingerichtet werden. Aus den Ergebnissen wird ein Beitrag zur Klärung der unter CS_2 gesteigerten Proteinsynthese bei gleichzeitiger Abnahme der Aktivität mikrosomaler Enzyme erwartet.

Diese Untersuchungen sollen ergänzt werden durch Daten über die Verteilung und Elimination von CS_2 aus verschiedenen Leberzellfraktionen. Hierzu soll in physiol. Kochsalzlösung gelöster $^{14}CS_2$ eingesetzt werden. Ratten sollen das Agens subcutan erhalten. Sein Verbleib soll vor allem in den Mikrosomen (aber auch im Cytoplasma der Leberzelle und Serum) über die Zeit bestimmt werden. Auch für diese Studie soll ein analytisches Verfahren ausgearbeitet werden.

3. M e t h o d e n

3.1. Tiere und Tierhaltung

Als Versuchstiere dienen weibliche Wistar-Ratten von der Versuchstierzuchtanstalt Bäumler in Wolfratshausen/Bayern. Die Tiere, die $^{14}CS_2$ erhalten, wiegen 190 bis 210 g, diejenigen, die ^{3}H-Phenylalanin bekommen, 160 bis 220 g.

Die Ratten werden unter konstanten Bedingungen (23° C) gehalten, ihre Nahrung besteht aus "Altromin-Futter" und Leitungswasser ad libitum.

3.2. Tierversuche

3.2.1. mit ^{3}H-Phenylalanin

3.2.1.1. Exponierung der Versuchstiere in Schwefelkohlenstoff

Folgende Expositionsanlage (s. Abb. 1) wird verwendet:

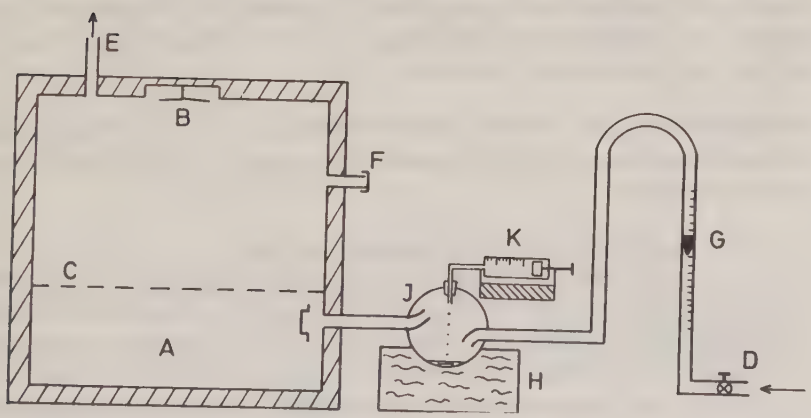

Abb. 1 - Expositionsanlage

A Expositionskammer, B Ventilator, C Rost, D Preßluftanschluß, E Abzug, F Kanüle, G Rotameter, H Ultrathermostat, J Mischkugel, K Infusionspumpe

Ein Glaskasten (72 x 52 x 52 cm, Rauminhalt: 194,7 l), durch einen Stahlrahmen armiert, dient als Expositionskammer (A). Flüssiger Schwefelkohlenstoff (p.a. Merck) wird von einer Infusionspumpe (Perfusor B, Typ 71102, Braun/Melsungen) (K) kontinuierlich in eine gläserne Gasmischkugel (Durchmesser: 14 cm) (J) eingetropft und in dieser über einem Wasserbad (Colora Ultrathermostat NB-32653) (H) von 47° (Siedepunkt des CS_2) verdampft. Aus der hauseigenen Preßluftanlage (D) wird rotametrisch (G) dosierte Frischluft in die Mischkugel geleitet. Von hier strömt das Schwefelkohlenstoff-Luftgemisch in die Expositionskammer (A). Die Expositionsatmosphäre wird durch einen an der Decke der Kammer befindlichen Ventilator (B) ständig umgewälzt. Das überschüssige CS_2-Luftgemisch wird über den Laborabzug abgeleitet. Durch Variation der über das Rotameter einströmenden Luft und/oder Änderung der eintropfenden CS_2-Menge wird die gewünschte Konzentration (20, 200, 400 ppm) eingestellt.

Die Tiere werden während der Exposition in Drahtkäfigen (16 x 24 x 34 cm) gehalten, die auf einem Metallrost (C) stehen. In die Käfige wird Trockenfutter gelegt und Flaschen mit Trinkwasser eingehängt. Die Raumtemperatur beträgt 23 $\pm$ 1° C. Die Exponierungen erfolgen zwischen 0 und 8.00 Uhr.

Kontrolltiere: Die Kontrolltiere werden in der oben beschriebenen Expositionsanlage unter gleichen Bedingungen, jedoch ohne CS_2-Zugabe gehalten.

3.2.1.2. Einbau von ^{3}H-Phenylalanin in vivo

Eine Std nach Exposition wird den Ratten 35 µCi ^{3}H-Phenylalanin, gelöst in 0,4 ml physiol. NaCl i.p. injiziert. Nahrung und Trinkwasser werden entzogen. Nach 90 min werden in leichter Äthernarkose die Karotiden eröffnet. Das ausfließende Blut wird in einem Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Die Lebern werden entnommen, gewogen und bis zur weiteren Verarbeitung (s. unten) mit Phosphatpuffer pH 7,4 befeuchtetem Filterpapier in Eis gebettet.

Kontrolltiere: Kontrollen sind solche Ratten, die in der Expositionsanlage über 8 Std Luft ohne CS_2-Zusatz gehalten werden.

3.2.2. Applikation und Einwirkung von radioaktivem Schwefelkohlenstoff ($^{14}CS_2$)

Drei Ratten werden je 1,5 ml/Tier physiol. Kochsalzlösung, die 15,4, 9,4 bzw. 4,6 µCi $^{14}CS_2$ (Herstellung s. Abschnitt 3.4.1.b) enthalten, subcutan (auf drei Hautdepots verteilt) injiziert. Dann werden die Ratten in je eine Maschendrahtreuse verbracht, die keine Bewegung der Tiere zuläßt (Abb. 2). Der Schwanz wird durch eine Öffnung im Verschlußkorken geführt. Die Reuse wird in einen durch eine Glasplatte abdeckbaren zylindrischen Glasbehälter gestellt.

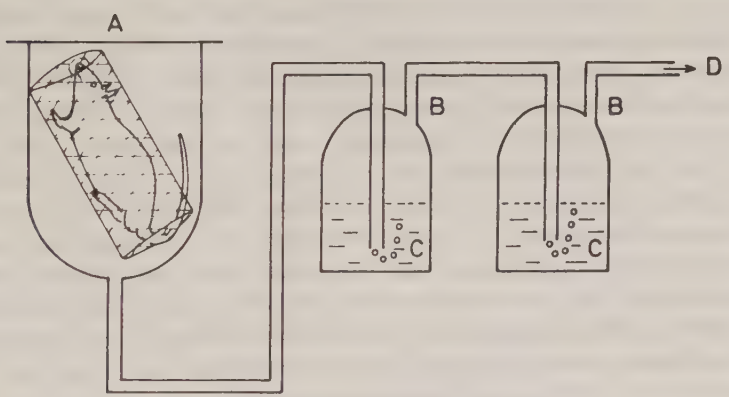

Abb. 2: Schema der Apparatur während der Versuche mit $^{14}CS_2$.
A: Glasgefäß mit -platte. B: Absorptionsflasche.
C: Reaktionsflüssigkeit. D: Anschluß zur Wasserstrahlpumpe.

Nach 30, 90 und 210 min wird aus der Schwanzvene Blut zur Aktivitätsbestimmung entnommen. Nach weiteren 30 min werden die Tiere in leichter Äthernarkose getötet, das aus den Carotiden fließende Blut ebenfalls zur Aktivitätsmessung aufgefangen und die Lebern zur weiteren Verarbeitung (s. unten) entnommen. Mit dem Zeitpunkt der Injektion werden den Tieren Nahrung und Wasser entzogen.

Die $^{14}CS_2$ enthaltende Ausatmungsluft des Versuchstieres wird mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe durch zwei Absorptionsgefäße ge-

saugt, die eine CS_2 in Form eines gelben Kupferkomplexes bindende Lösung, im folgenden auch Sperrflüssigkeit genannt, enthalten.

Zusammensetzung der Sperrflüssigkeit:

100 ml Piperidin (Merck Nr. 9724)
100 ml Triäthanolamin (Merck Nr. 8379)
0,2 g Kupferazetat (Merck Nr. 2711)
ad 1000 ml Äthanol (p.a. Merck Nr. 972)

Die Bindung des CS_2 beruht auf der Bildung eines gelben Kupferkomplexes; Triäthanolamin dient als Stabilisator und alkalisiert die Lösung.

3.3. Biochemisch-analytische Methoden

3.3.1. Leberzellfraktionierung

Die Isolierung der Mikrosomen und die Fraktionierung der übrigen Zellbestandteile wird in konventioneller Weise vorgenommen. Die Ratten werden durch Öffnen der Karotiden in leichtem Ätherrausch getötet. In der Kälte wird die Leber rasch entnommen, durch Scherenschläge zerkleinert und in einem Meßzylinder auf 20 ml mit Phosphatpuffer pH 7,4 aufgefüllt. Im Potter-Elvehjem-Glashomogenisator wird homogenisiert. Bei 9000 x g wird das Homogenat 30 min bei 0° C zentrifugiert. Die Fettmanschette wird anschließend abgesaugt. Der Überstand wird vom Sediment getrennt. Letzteres wird in der Kälte bis zur Probenbereitung aufbewahrt. Der Überstand wird zur weiteren Verarbeitung in vorgekühlte Zentrifugengläschen gefüllt, gut verschlossen und 90 min bei 78000 x g in der Ultrazentrifuge zentrifugiert.

Das 9000 x g-Sediment besteht aus Zellkernen, Mitochondrien und Blutelementen. Der Überstand enthält Cytoplasma, endoplasmatisches Retikulum und zelluläre Bruchstücke. Das 78000 x g-Sediment besteht aus Mikrosomen. Der 78000 x g-Überstand (Supernatant) enthält cytoplasmatische Bestandteile.

3.3.2. Isolierung der säureunlöslichen Gewebebestandteile

Zu 2 Teilen eines Homogenats der verschiedenen Zellfraktionen bzw. des Serums wird bei $+4^{\circ}$ C 1 Teil 30%ige TCA gegeben. Serum wird vorher mit dem 5-fachen Volumen, das 9000 x g-Sediment einer einzelnen Leber mit 20 ml, und die entsprechende Mikrosomen-Fraktion mit 2,5 ml aqua dest. verdünnt. Nach 1 Std wird die säureunlösliche Fraktion abzentrifugiert, mehrfach mit 80%igem

Äthanol, Aceton und Äther gewaschen und schließlich unter gelegentlichem Durchrühren bei 40° C getrocknet. Die Radioaktivität dieser Trockenpulver wird nach Verbrennen bestimmt.

3.3.3. Proteinbestimmung

Das Protein in Leberzellfraktionen und Serum wird mit der Biuret-Reaktion nach GORNALL u. Mitarb. (1949) bestimmt.

Reagenzien
1) Biuret-Reagenz (Asid-Institut G.m.b.H./München, Nr. 3125)
2) 0,9 %ige Kochsalzlösung

Ausführung: In Reagenzgläser werden je 4,9 ml physiol. Kochsalzlösung pipettiert, in das Leerwert-Reagenzglas 5,0 ml. Mit einer Eppendorf-Pipette werden je 0,1 ml Ultrazentrifugenüberstand, suspendiertes 9000 x g-Pellet (40 - 120 mg/ml Aqua dest.) oder Mikrosomensuspension (40 - 120 mg in 1 ml Aqua dest.) zugefügt. Je

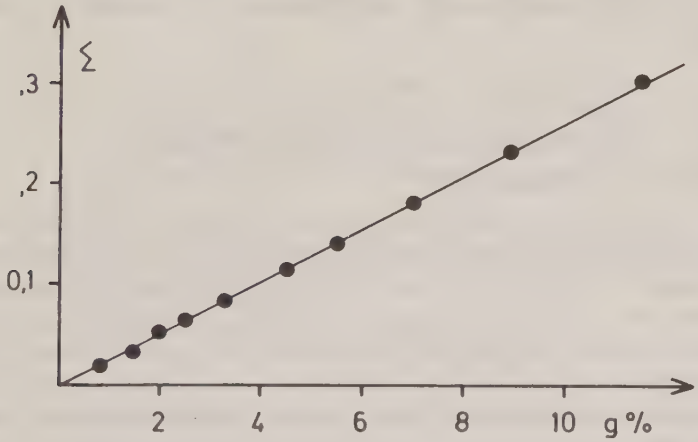

Abb. 3 - Proteineichkurve

5,0 ml Biuret-Reagenz werden zupipettiert. Nach 30 min werden die Extinktionen in einer Glasküvette (Schichtdicke 1 cm) im Eppendorf-Photometer mit Filter Hg 546 nm gemessen. An Hand einer

Eichkurve (Abb. 3) wird aus den Extinktionswerten die Eiweißmenge bestimmt. Die Eichkurve wird nach Vorlage verschiedener Mengen eines standardisierten Albuminpräparates (Lab-Trol$^{(R)}$) aufgenommen.

3.4. Markierte Verbindungen

3.4.1. Markierte Verbindungen

a) L-Phenylalanin [2,4 - T_2] der spezifischen Aktivität 9.000 mCi/mMol wird benutzt. Das Präparat stellt Priv.-Doz. Dr. Dr. Hempel vom Institut f. Med. Strahlenkunde, Würzburg, freundlicherweise zur Verfügung.

b) Radioaktiver Schwefelkohlenstoff: ^{14}C-markierter CS_2 wird von THE RADIOCHEMICAL CENTRE, Amersham, England bezogen. Die Verbindung hat folgende Konstanten:

Spezifische Aktivität:	60,0	mCi/mM
	770	µCi/mg
Molekulargewicht:	78	(bei dieser spezif. Aktivität)

$^{14}CS_2$ wird durch Reaktion von ^{14}C-Acetylen mit Schwefel hergestellt:

$$HC{\equiv}CH + 5\ S \longrightarrow 2\ CS_2 + H_2S$$

3.4.2. Prüfung der radiochemischen Reinheit

3.4.2.1. ^{3}H-Phenylalanin

Die radiochemische Reinheit dieser Aminosäure wird am Tage vor jedem Tierversuch durch Radiodünnschichtchromatographie überprüft. Hierzu wird etwa 1 - 10 µCi der radioaktiven Probe zusammen mit inaktivem Phenylalanin (10 - 20 µg) auf eine Dünnschichtplatte aufgetragen und aufgetrennt. Anschließend wird mit Ninhydrin-Reagenz (0,2 %ige Ninhydrin-Lösung in Aceton) gefärbt und die Aktivitätsverteilung auf dem Chromatogramm mit einem Zähler (Radiochromatogram Scanner, Model 7201 der Fa. Packard) bestimmt.

Abb. 4 gibt ein Beispiel für eine Reinheitsprüfung. Radioaktivität findet sich praktisch nur an der Stelle des Phenylalanin-Flecks. Die radiochemische Reinheit ist größer als 95 %.

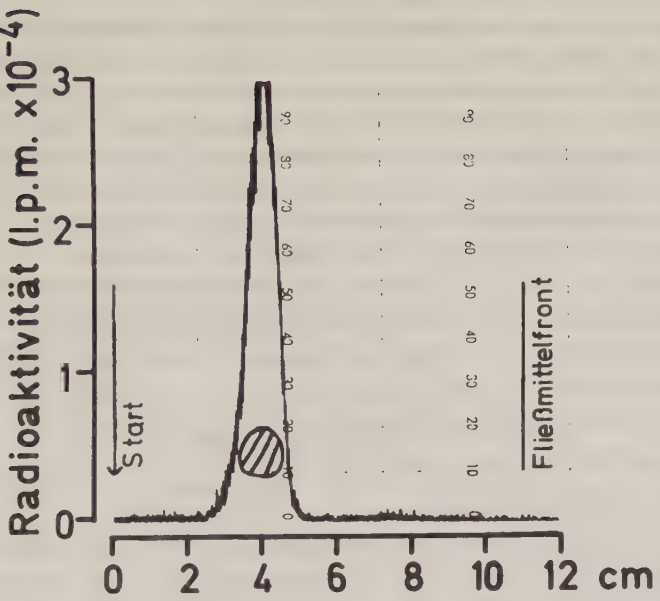

Abb. 4 - Dünnschichtchromatographische Reinheitskontrolle von ^{3}H-Phenylalanin
Laufmittel: n-Butanol/Eisessig/H_2O (4:1:5, organische Phase)
Platte: Kieselgel - Merck, 0,02 mm Schichtdicke
Messung mit Radiochromatogram Scanner (Model 7201), Packard, La Grange, Ill.
Referenz mit Ninhydrin nachgewiesen.

3.4.2.2. $^{14}CS_2$-

Laut Angabe des Herstellers beträgt die radiochemische Reinheit 99 %, die Verunreinigung an CH_2S, überprüft mit Hilfe Infrarotspektroskopie, 0,5 %. Um bei der Herstellung der Injektionslösung entstandene Verunreinigungen auszuschließen, wird die radiochemische Reinheit unmittelbar vor Injektion nochmals durch einen umgekehrten Isotopen-Verdünnungsversuch bestimmt.

3.4.2.2.1. Vorbemerkung zur Methode

Bei der umgekehrten Isotopen-Verdünnungsmethode wird die radiochemische Reinheit der zu prüfenden Substanz mit der chemischen Reinheit eines zugesetzten Trägers verglichen. Praktisch geht man so vor, daß der interessierenden markierten Verbindung ein großer Überschuß der analysenreinen inaktiven Substanz als Träger zugesetzt und die spezifische Aktivität des Produkts vor und nach Reinigung bzw. Derivatisierung bestimmt wird. Die radiochemische Reinheit kann dann anhand der Gleichung

$$\text{radiochem. Reinheit} = \frac{\text{spez. Aktivität nach Reinigung bzw. Derivatisierung}}{\text{spez. Aktivität vor Reinigung}}$$

berechnet werden. In den vorliegenden Untersuchungen wird zu diesem Zweck aus Schwefelkohlenstoff ein Derivat, und zwar Diphenylthioharnstoff synthetisiert:

$$CS_2 + 2\ C_6H_5NH_2 + KOH \longrightarrow S = C(NHC_6H_5)(NHC_6H_5) + KHS + H_2O$$

Praktische Durchführung:
Eine der eingefrorenen CS_2-Lösungen (s. S.15) wird aufgetaut und im Schütteltrichter mit 15 ml analysenreinem CS_2 vermischt. Dann werden zur Bestimmung der spezifischen Aktivität vor Reinigung 3 Proben à 0,1 ml entnommen und die Radioaktivität im Flüssigkeitsscintillationszähler ("Tricarb") gemessen. Dann wird aus dem CS_2 Diphenylthioharnstoff dargestellt und die Aktivität einer eingewogenen Menge des reinen Produktes gemessen. Aus den gemessenen spezifischen Aktivitäten (µCi/µMol) wird dann die radiochemische Reinheit des injizierten CS_2 berechnet.

3.4.2.2.2. Arbeitsvorschrift zur Synthese von ^{14}C-Diphenylthioharnstoff (VOGEL 1957)

Eine Mischung von 15 ml CS_2 (+ $^{14}CS_2$), 15 ml Anilin, 25 ml Aethanol und 3,5 g feingepulvertem KOH wird 8 Std unter Rückfluß gekocht. Anschließend wird die Hauptmenge an überschüssigem CS_2 und Aethanol bei Normaldruck abdestilliert. Der restliche Aethanol wird nach Abkühlen und Wechseln der Vorlage mit der Wasserstrahlpumpe abgezogen. 120 - 140 ml verdünnte HCl (2,5 %ig) werden tropfenweise unter kontinuierlichem Rühren (Magnetrührer) zugegeben. Entstehendes H_2S wird in KOH-Lösung eingeleitet. Dabei fällt ein silbrig-weißer Niederschlag aus. HCl wird

bis zur sauren Reaktion zugefügt. Unter mehrmaligem Lüften des Stopfens wird der Kolben kräftig geschüttelt. Der Niederschlag wird abgenutscht und solange mit Aqua dest. gewaschen, bis das Waschwasser nicht mehr sauer reagiert. Die Ausbeute sind etwa 12 g feuchtes Rohprodukt. Das gut abgesaugte, nicht getrocknete Rohprodukt wird nun mit so viel Aethanol (etwa 20 ml) aufgeschlämmt, bis ein dicker Brei entsteht. Nach erneutem Absaugen bleiben etwa 11 g übrig. Diese werden aus 200 - 250 ml Aethanol umkristallisiert. Nach 12-stündigem Trocknen im Exsiccator bleiben etwa 8,5 g trokkene Substanz übrig, die bei 154° C schmilzt. Das analysenreine Produkt schmilzt nach VOGEL (1957) bei 154° C. Vor der Radioaktivitätsmessung wird die Verbindung noch zweimal aus Aethanol umkristallisiert.

3.4.3. Herstellung der $^{14}CS_2$-Injektionslösung

Eine injizierbare $^{14}CS_2$-haltige Lösung wird aus dem vom Hersteller gelieferten gasförmigen $^{14}CS_2$ durch Lösen in physiol. NaCl-Lösung bereitet. Hierzu wird auf die mit einem Zerschlagventil verschlossene $^{14}CS_2$-Ampulle (1 mCi) ein 10 ml physiol. NaCl und einen in Teflon eingeschmolzenen Stabmagneten enthaltendes Reagenzglas über einem Schliff gasdicht eingeschlossen. Nach Zerschlagen des Ventils durch Anlegen eines Magnetfeldes von außen wird die NaCl-Lösung anschließend durch 4-stündiges Schütteln bei 20° C mit CS_2 gesättigt. Die gesättigte Lösung wird in Portionen à 2 ml in Schliffgläser (5 ml) abgefüllt und eingefroren. Die einzelnen Proben werden erst vor Versuchsbeginn wieder aufgetaut.

3.4.4. Radioaktivitäts-Messungen mit dem Flüssigkeitsscintillations-Zähler

3.4.4.1. Bereitung der Proben

3.4.4.1.1. durch Kolbenverbrennung

Trockenpulver von Gewebefraktionen mit ^{3}H-Aktivität werden nach KALBERER und RUTSCHMANN (1961) verbrannt. Die Verbrennung erfolgt in einem 500 ml Jenaer-Glaskolben. Die Proben werden in rückstandfrei verbrennendes Filterpapier eingewogen. Dieses wird vorher so zugeschnitten, daß sich ein Täschchen mit einer etwa 2 cm langen "Lunte" falten läßt. Die Proben werden in Platindrahtnetze, die in die Schliffstopfen eingeschmolzen sind, eingelegt. Platin dient als Katalysator für die Verbrennung. Die Glaskolben werden in einer Kältemischung aus Azeton und Trockeneis

(Dewargefäß) vorgekühlt. Aus der Bombe wird Sauerstoff in den Kolben geleitet. Die Probe wird am Bunsenbrenner entzündet und unter erneutem Kühlen im gut verschlossenen Kolben abgefackelt. Bis der Wasserdampf kondensiert ist wird gekühlt. Unter dem Abzug wird der Kolben vorsichtig geöffnet und 15 ml HCl-Medium (13,6 ml 2n HCl auf 1000 ml wasserfreies POPOP-Medium) zugegeben. Um ein Hochspringen der Stopfen zu vermeiden, werden diese mit Gummizügen gesichert. 60 min wird auf der Maschine bei langsamen Bewegungen geschüttelt, um das Kondenswasser im Medium zu lösen. Die Lösung wird in "Tricarb-Gläschen"+ gegeben und nach 24 Std Stehenlassen in der Kälte (4° C) im Flüssigkeitsscintillations-Zähler (Beschreibung s. S.17) gemessen.

3.4.4.1.2. Lösen feuchter Organproben in Soluene(R)

Lösen der feuchten Proben in Soluene(R) und Bestimmung der Aktivität in dieser Lösung.

3.4.4.1.2.1. Versuche mit ^{3}H-Phenylalanin

Feuchte Proben der Leberfraktionierung werden in Jenaer-Glasröhrchen eingewogen (bis 100 mg) und mit je 1 ml Soluene(R) (organisches Lösemittel) versetzt. Die mit Parafilm sorgfältig verschlossenen Gläser werden im Warburg-Apparat 12 Std bei 37° C bewegt. Danach sind alle Proben gelöst. Dann werden 15 ml HCl-Medium zugefügt und die Lösung in Meßgefäße überführt.

3.4.4.1.2.2. Versuche mit $^{14}CS_2$

Im Unterschied zu ^{3}H-Phenylalanin werden wegen der Flüchtigkeit des $^{14}CS_2$ die Gewebeproben in verschlossenen Meßgefäßen gelöst. Die Gläser werden 12 Std in einem Wärmeschrank bei 37° C belassen.
Folgendes Vorgehen verhütet einen Verlust des leichtflüchtigen Meßgutes aus der Dampfphase: die Kunststoffdeckel der "Tricarb-Gläschen"+ werden mit einem Rosenbohrer (Stärke 3) durchbohrt. Polyvinyl-Deckeleinlagen dichten die durchbohrten Deckel während des Lösungsvorganges ab. Nach dem Lösen werden 15 ml Sperrmedium mit einer Spritze durch das vorgebohrte Loch und das Kunststoffplättchen unter mehrmaligem Aufziehen und vorsichtigem Schütteln in das Glas eingespritzt. Danach werden die perforierten Deckel

+ das sind speziell zu Messungen im Flüssigkeitsscintillations-Zähler verwendete Probengläser.

gegen intakte ausgetauscht. Da bei in Soluene$^{(R)}$ gelösten aktiven Proben die gleiche Aktivität gemessen wurde wie bei der Kolbenverbrennung von Trockenpulver, wählten wir für die im folgenden mitgeteilten Untersuchungen das einfachere "Soluene-Verfahren".

3.4.4.1.3. Scintillator-Lösungen

3.4.4.1.3.1. POPOP-Medium
(verwandt für in Soluene$^{(R)}$ gelöste Gewebsproben)

0,2 g POPOP (1,4-Bis(2,5-phenyloxazolyl)-benzol
+ 8,0 g PPO (2,5-Diphenyloxazol)
ad 2000,0 ml Toluol - 24 Std stehenlassen, dann
1260,0 ml Isopropanol und 40 ml 2 N HCl zugeben.

3.4.4.1.3.2. Sperrmedium
(benutzt bei allen Versuchen mit $^{14}CS_2$)

Es enthält außer POPOP-Medium Zusätze, die mit CS_2 eine schwerflüchtige Verbindung bilden. Zu seiner Herstellung werden 5 ml Piperidin, 0,0167 g Cu-Acetat mit POPOP-Medium auf 1000 ml aufgefüllt und 12 Std bei Zimmertemperatur in einer Schliff-Flasche auf der Maschine geschüttelt.

3.4.4.1.4. Aktivitäts-Messungen mit dem Flüssigkeitsscintillations-Zähler

3.4.4.1.4.1. Prinzip der Messung

Im Flüssigkeitsscintillations-Zähler werden die Lichtblitze gemessen, die bei der Wechselwirkung zwischen einer ionisierenden Strahlung, vor allem ß- und γ-Strahlen, und einem in der Lösung befindlichen Scintillator, z.B. Anthracen, entstehen. Die Zahl der Lichtblitze ist ein Maß für die Zahl der radioaktiven Zerfälle und die Intensität der Lichtblitze ein Maß für die Energie der ionisierenden Strahlung. So können beispielsweise die ß-Teilchen des Tritium aufgrund ihrer geringen Energie (mittlere Elektronenenergie MeV = 0,005) von der energiereichen ß-Strahlung von ^{14}C (mittlere Elektronenenergie MeV = 0,05) unterschieden werden.

3.4.4.1.4.2. Messung der Proben

Für die Radioaktivitäts-Messung muß das Meßgut in der im Scintillator enthaltenen Lösung gelöst werden (s. 3.4.4.1.3.). Die Zahl der bei einer bestimmten radioaktiven Substanz, z.B. Tritium oder ^{14}C pro 100 radioaktive Zerfälle gemessenen Impulszahl

(= Zählausbeute) hängt von der Beschaffenheit des Scintillator-Mediums ab. Gefärbte Stoffe oder bestimmte chemische Stoffklassen (z.B. Carbonyle, organische Halogen-Verbindungen u.a.m.), die leicht mit dem Zählgut in die Meßprobe gelangen können, vermindern die Zählausbeute. Alle die Ausbeute vermindernden Faktoren werden unter dem Sammelbegriff "quench" (engl. auslöschen) zusammengefaßt. Für die exakte Messung der Radioaktivität ist es von größter Wichtigkeit, die Zählausbeute jeder Probe, unabhängig von Zufälligkeiten des quenchs, zu messen.

3.4.4.1.4.3. Bestimmung der Zählausbeute durch externe Standardisierung

Bei dem benutzten Scintillations-Zähler TriCarb (Modell 3380, Fa. Packard, La Grange, Ill., USA) wird die Ausbeute jeder einzelnen Probe mit Hilfe der automatischen externen Standardisierung gemessen.

Jede Art von quench wirkt sich im Prinzip so aus, daß die einzelnen Lichtblitze im Mittel weniger Photonen enthalten als bei einer ungequenchten Probe. Mit geeigneten elektronischen Schaltkreisen - Diskriminatoren - ist es möglich, die Lichtblitze nach Stärke zu ordnen. Das benutzte Gerät besitzt für die Ausbeute-Bestimmung 2 zusätzliche Diskriminatoren. Diese werden zunächst so eingestellt, daß bei einer ungequenchten inaktiven Probe (vereinbarungsgemäß ein vom Hersteller mitgelieferter unter Argon abgeschmolzener Toluol-Scintillator) die gleiche Zahl an starken und schwachen Lichtblitzen gemessen wird, wenn diese Scintillation von außen durch eine im Gerät eingebaute Radium-Americium-Strahlenquelle (= externer Standard) hervorgerufen werden. Ein geräteeigener Rechner bestimmt aus dem Meßergebnis sofort ein Impulszahlverhältnis (= AES-Ratio).

$$\text{AES-Ratio} = \frac{\text{Zahl d. energiereichen Impulse/min}}{\text{Zahl d. energiearmen Impulse/min}}$$

Dabei wird durch eine zusätzliche Messung in Abwesenheit der Strahlenquelle bei Ausgabe der AES-Ratio sofort Nulleffekt und mögliche Eigen-Radioaktivität der Probe von den insgesamt gezählten Impulsen abgezogen.

Die AES-Ratio-Messungen erlauben mit Hilfe einer entsprechenden Eichkurve die genaue Zählausbeute jeder einzelnen Probe zu bestimmen.

Praktisch geht man dabei so vor, daß für einen Standard bekannter Radioaktivität bei konstanter Einstellung des Zählers Ausbeute

Abb. 5 - Quenchkurven für Flüssigkeitsscintillations-Zähler (Tri-Carb 1 und Tri-Carb 2), hergestellt mit steigenden Mengen Methylrot (5, 10, 20, ... 100 µl), 15 ml Medium, ^{3}H-Standard.

und AES-Ratio-Werte für unterschiedlich gequenchte Scintillator-Lösungen gemessen werden (Quenchkurve). Der Quench kann durch einen Farbstoff oder durch Zugabe farbloser Substanzen hervorgerufen werden.

Abb. 5 zeigt die Quenchkurve für Tritium, gemessen im Scintillator-Medium POPOP. Alle Messungen erfolgen bei einer vom Hersteller fest einprogrammierten Einstellung (= ^{3}H). Die Ausbeute sinkt mit abnehmendem AES-Ratio stetig ab. Die Quenchkurven der beiden für unsere Messungen verfügbaren Zähler (Tri-Carb 1 und 2) sind unterschiedlich. Verwendet man an Stelle von Methylrot eine andere quenchende Substanz, z.B. Chloroform oder Pikrinsäure, so erhält man eine identische Quenchkurve wie in Abb. 5.

AES-Ratio als Funktion der im Scintillator gelösten Proteinmenge

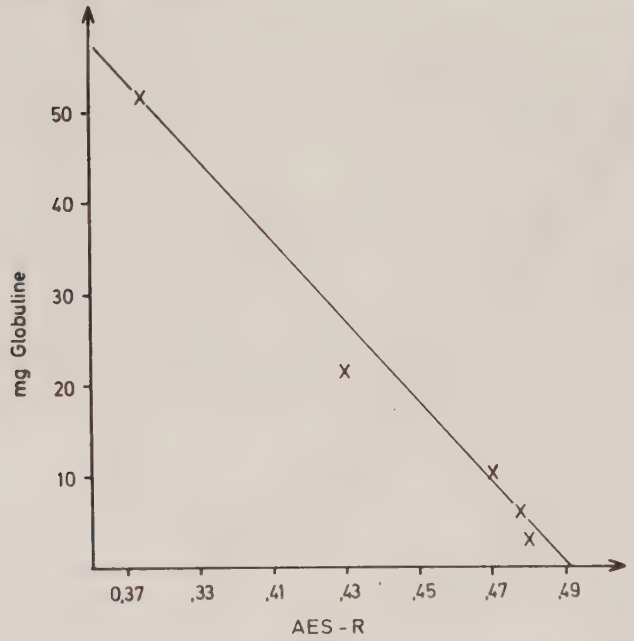

Abb. 6: Quenchwirkung durch Soluene(R). Steigende Mengen Globuline gelöst in 1 ml Soluene.

Auch in Soluene$^{(R)}$ gelöstes Globulin quencht (Abb. 6), der Wert des AES-Ratios sinkt mit zunehmendem Globulin-Gehalt. Dabei dürfte es sich in erster Linie um einen Farbquench handeln, da Proben mit viel Globulin gelb verfärbt sind.

Solche Quenchkurven werden für ^{3}H und ^{14}C bei allen benutzten Scintillator-Lösungen erstellt.

3.4.4.1.4.4. Bestimmung der Zerfälle pro min einer Probe

Für die im Scintillator gelöste radioaktive Probe wird zunächst im Flüssigkeitsscintillations-Zähler der AES-Ratio-Wert und die Zahl der Impulse pro min auf $\partial < \pm$ 3 % gemessen. Beide Werte werden vom Gerät ausgedruckt. Vorher wird der Nulleffekt (Impulse durch Höhenstrahlung, elektronisches Rauschen), der anhand von 3 inaktiven Proben bestimmt und in das Gerät eingegeben wird, automatisch abgezogen. Für jede Probe wird mit Hilfe des AES-Ratio-Wertes in der Quenchkurve die absolute Ausbeute abgelesen und daraus die Zerfälle pro min berechnet.

3.4.4.1.4.5. Auswertung

Die Radioaktivität (Zpm) jeder Gewebeprobe wird durch Doppelbestimmung ermittelt. Aus dem nach GORNALL et al. (1949) bestimmten Proteingehalt (mg Protein pro 1 g Naßfraktion) und der Radioaktivität pro 1 g Probe (Zpm) wird die Aktivität von 1 g Protein berechnet. Alle Aktivitäten werden normiert auf die Dosierung 1 µCi/1 g.
Zur Bestimmung der pro Ratte injizierten Aktivitäten werden bei jedem Versuch 0,1 ml der ^{3}H-Phenylalanin-Injektionslösung mit 0,01 N HCl auf 25 ml aufgefüllt und die Radioaktivität von drei 0,1 ml-Proben gemessen.

3.5. Statistische Auswertung

Die biometrische Auswertung der Versuchsergebnisse wird nach den Angaben von THER (1965) vorgenommen.

Aus den einzelnen Meßergebnissen x_i werden der Mittelwert $\bar{x}$ und die Standardabweichung $s_{\bar{x}}$ nach den folgenden Formeln berechnet:

$$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n} \; ; \; SAQ = \sum x_i^2 - \frac{(\sum x_i)^2}{n} \; ; \; s_x^2 = \frac{SAQ}{n-1} \; ; \; s_{\bar{x}} = \frac{s_x}{\sqrt{n}} \; ;$$

n = Anzahl der Versuche
SAQ = Summe der Abweichungsquadrate

Die Berechnung der Signifikanz mit Hilfe des t-Tests wird nach der Formel

$$t = (\bar{x}_1 - \bar{x}_2)\sqrt{\frac{(n_1 + n_2) - 2}{n_1 + n_2} \cdot \frac{n_1 \cdot n_2}{s^2_{x_1}(n_1 - 1) + s^2_{x_2}(n_2 - 1)}}$$

vorgenommen.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Fragestellung stellt der P-Wert dar. Dieser wird einer t-Tafel unter Berücksichtigung des Freiheitsgrades entnommen: FG = $(n_1 + n_2) - 2$.

Die Mittelwertangaben in den Tabellen des Ergebnisteils erfolgen als: $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$.

Die P-Werte in diesen Tabellen werden wie folgt angegeben:

P $\ll$ 0,001 = hochsignifikantes Ergebnis
P $<$ 0,01 = signifikantes Ergebnis
P $<$ 0,05 = schwach signifikantes Ergebnis
P Ø = nicht signifikantes Ergebnis ($>$0,05)

4. Ergebnisse

4.1. Verteilung und Elimination von ^{14}C-markiertem Schwefelkohlenstoff

Drei 195, 203 bzw. 207 g schwere Ratten erhalten 15,4, 9,4, bzw. 4,6 µCi ^{14}C-markierten Schwefelkohlenstoff in physiol. NaCl-Lösung subcutan. Die Bestimmung der Radioaktivität im Blut zeigt (Tab. 1), daß der nach 30 min aufgebaute ^{14}C-Spiegel über 2 1/2 Std. annähernd erhalten bleibt. Nach weiteren 30 min sinkt dieser merklich ab.

Tab. 1 - Aufbau eines über 4 Std. gleich hohen $^{14}CS_2$-Spiegels im Blut nach s.c. Injektion von $^{14}CS_2$ (Versuche an 3 Ratten)

Zeit nach Versuchsbeginn (min)	Zpm · 10^4/ml Vollblut
30	2,32 ± 0,17
90	1,88 ± 0,20
210	2,10 ± 0,30
240	1,48 ± 0,31

Innerhalb von 4 Std. nach der s.c. Injektion werden zwischen 4,5 und 13,1 % der applizierten Aktivität abgeatmet (Tab. 2). Anschliessend werden rund 1 % (0,8 - 1,3 %) in der Leber gefunden, während ungefähr 90 % (85,9 - 94,7 %) im hepatektomierten Tier verbleiben (Tab. 2).

Tab. 2 - Verteilung der ^{14}C-Aktivität in Ratten 4 Std. nach s.c. Injektion von $^{14}CS_2$

	µCi			% der applizierten Aktivität		
	1.Ratte	2.Ratte	3.Ratte	1.Ratte	2.Ratte	3.Ratte
Injizierte Aktivität	15,4	9,4	4,6			
abgeatmete Aktivität	0,69	1,2	0,4	4,5	13,1	9,1
Aktivität in d. Leber+	0,13	0,1	0,06	0,8	1,11	1,32
Aktivität in d. hepatektomierten Ratte	14,58	8,1	4,14	94,7	85,9	89,6
Ratten-Gewicht (g)	203	195	207			
Leber-Gewicht (g)	5,62	5,47	5,87			

+ nichtflüchtiger Anteil

Von jeder Leber wird ein Homogenat hergestellt und dieses bei 9000 x g zentrifugiert. Rund 60 % der in der Leber vorkommenden Aktivität entfallen auf den Überstand, der Rest auf das Sediment (Tab. 3).
Der Überstand wird bei 78000 x g fraktioniert. Die Aktivitätsanteile sind im Supernatant und in der Mikrosomenfraktion gleich (Tab. 3).

Tab. 3 - ^{14}C-Aktivitäten in Leberzellfraktionen und ihre prozentuale Verteilung (nichtflüchtiger Anteil).

	Zpm/Gesamt-Leberprotein			wiedergefund. Aktiv. in %		
	1.Ratte	2.Ratte	3.Ratte	1.Ratte	2.Ratte	3.Ratte
Homogenat	$2{,}86 \cdot 10^5$	$2{,}33 \cdot 10^5$	$1{,}36 \cdot 10^5$	100	100	100
9000 x g Überstand	$2{,}07 \cdot 10^5$	$1{,}6 \cdot 10^5$	$7{,}79 \cdot 10^4$	69	68	52
9000 x g Sediment	$1{,}12 \cdot 10^5$	$9{,}5 \cdot 10^4$	$5{,}04 \cdot 10^4$	39	40	37
78000 x g Überstand	$8{,}57 \cdot 10^4$	$4{,}68 \cdot 10^4$	$4{,}71 \cdot 10^4$	39	29	60
78000 x g Sediment (=Mikrosomen)	$8{,}56 \cdot 10^4$	$4{,}73 \cdot 10^4$	$3{,}72 \cdot 10^4$	39	29	47

4.2. Einbau von ^3H-markiertem Phenylalanin in Leber und Serum

Ratten werden 20, 200, bzw. 400 ppm CS_2/8 Std. exponiert. Sofort danach werden 30 - 40 µCi ^3H-Phenylalanin i.p. injiziert. Nach 90 min werden die Tiere getötet und die ^3H-Aktivität im Serum und verschiedenen Leberfraktionen gemessen. Nach einer Vorbehandlung in 200 ppm/8 Std werden rund 12 %, nach 400 ppm/8 Std rund 26 % mehr ^3H-Phenylalanin in die Mikrosomen eingebaut (Tab. 4, Abb. 7). Dieser Effekt ist nach 52 Std nicht mehr nachzuweisen. Auch verändert eine Exponierung in 20 ppm/8 Std die Einbaurate nicht (Abb. 7). Aus den in der Tab. 4 zusammengestellten Analysenwerten geht weiter hervor, daß der Einbau von ^3H-markiertem Phenylalanin in Serum, 78000 x g-Überstand ("Supernatant"), bzw. 9000 x g-Sediment nach CS_2-Einwirkung normal bleibt.

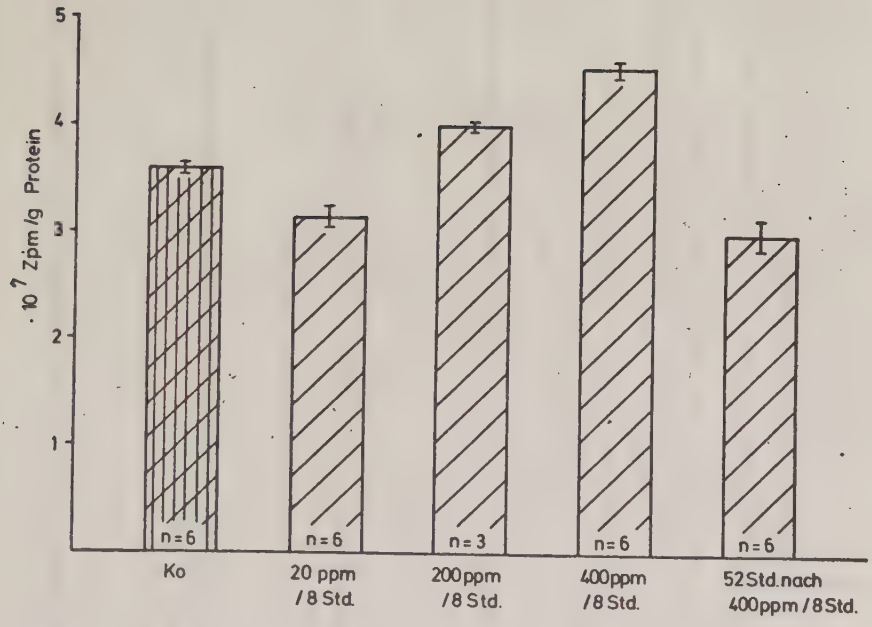

Abb. 7 - Einbau von ^{3}H-Phenylalanin in Lebermikrosomen nach Exponierung in Schwefelkohlenstoff.

Tab. 4 - Einbau von ^{3}H-Phenylalanin in verschiedene Leberzellfraktionen und in Serum nach Exponierung in CS_2, ausgedrückt als $\cdot 10^7$ Zpm/g Protein ($\bar{x} \pm s\bar{x}$)

	Kontrollen	Vorbehandlung in 20 ppm/8 Std	Vorbehandlung in 200 ppm/8 Std	Vorbehandlung in 400 ppm/8 Std	52 Std nach Vorbehandlung in 400 ppm/8 Std
Mikrosomen	3,62 ± 0,094	3,15 ± 0,19	4,04 ± 0,127	4,55 ± 0,149	2,96 ± 0,225
P		0,05	0,05	< 0,001	0,02
n	6	6	3	6	6
9000 x g Sediment	1,65 ± 0,092	1,55 ± 0,181	1,35 ± 0,107	1,45 ± 0,134	1,25 ± 0,182
P		0,65	0,1	0,25	0,10
n	6	6	3	6	6
Supernatant	2,2 ± 0,047	2,14 ± 0,095	2,64 ± 0,111	2,9 ± 0,289	2,02 ± 0,121
P		0,65	0,60	0,05	0,20
n	6	6	3	6	6
Serum	4,27 ± 0,249	4,96 ± 0,289	5,96 ± 0,354	5,4 ± 0,329	5,16 ± 0,303
P		0,20	0,50	0,05	0,20
n	3	6	3	6	6

5. Diskussion

Die Aufgabe der vorliegenden Untersuchungen bestand in der Bearbeitung von zwei Fragestellungen. Zunächst wurde die Verteilung von markiertem Schwefelkohlenstoff in Leberzellfraktionen studiert. In einem zweiten Ansatz wurde der Einbau einer markierten Aminosäure in Rattenlebermikrosomen nach Vorbehandlung in bestimmten CS_2-Konzentrationen untersucht. Die Resultate beider Versuchsgänge sollten zur Erklärung der Inhibitorwirkung von CS_2 auf mischfunktionelle Leberoxydasen beitragen. Trotz dieser gemeinsamen Grundlage sollen die beiden Versuchsteile getrennt diskutiert werden.

5.1. $^{14}CS_2$ in Leberzellfraktionen und Serum

Markierter Schwefelkohlenstoff wurde bisher nur von wenigen Untersuchern zu Verteilungs- und Eliminationsstudien eingesetzt. BÜSING et al. (1953) exponierten Mäuse mehrere Tage ununterbrochen einer Atmosphäre, die $C^{35}S_2$ enthielt. In den großen Körperorganen wurde das Schwefelisotop ^{35}S bestimmt. Hierbei fanden die Autoren, daß eine Sättigung der Organe mit dem aus dem CS_2 stammenden Schwefel erst nach mehreren Wochen eintritt. Der aktive Schwefel wird aus dem Hirn weit langsamer ausgeschieden als aus der Leber, den Nieren oder dem Herzmuskel. Aus den mitgeteilten Daten läßt sich errechnen, daß der ^{35}S mit einer Halbwertzeit von 2 Tagen aus der Leber der Maus eliminiert wird. Eine fast gleiche Halbwertzeit für dieses Organ ist den an $C^{35}S_2$-exponierten Meerschweinchen erhobenen Befunden von STRITTMATTER et al. (1950) zu entnehmen. Außerdem fanden diese Autoren - im Gegensatz zu BÜSING et al. (1953) - daß die Leber stärker als das Blut oder die anderen Körperorgane mit ^{35}S (beim Meerschweinchen) nach Exponierung in $C^{35}S_2$ oder intracardialer Injektion von $C^{35}S_2$ beladen wird. Offensichtlich wird ein Teil des CS_2-Schwefels für körpereigene Synthesen benutzt. Einem gleichen Schicksal scheint jedoch der CS_2-Kohlenstoff nicht zu unterliegen. Dies geht aus unserem Befund hervor, wonach die injizierte ^{14}C-Aktivität (vom $^{14}CS_2$) im Blut von Ratten innerhalb von 30 min um fast ein Drittel nach abgeschlossener Resorption abgesunken ist.

Diese von uns für $^{14}CS_2$ gefundene schnelle Elimination aus dem Blut stimmt mit den Angaben von FREUNDT und SCHNAPP (1970) über-

ein. Sie fanden (mit Hilfe von konventionellen chemischen CS_2-Bestimmungen), daß der inhalierte CS_2 mit einer Halbwertzeit von rund 30 min aus dem Blut von Ratten verschwindet. Dieser Wert deckt sich in der Größenordnung mit den bei Hund (McKEE et al. 1943) und Mensch (McKEE et al. 1943, DEMUS 1953, 1964) herrschenden Verhältnissen, aus dem Kaninchenblut verschwindet der CS_2 langsamer ($t\ ^1/_2$ = 94 min) (BÜSING und BOHLÄNDER 1952).

Bisher wurden im Schrifttum keine Angaben über die Verteilung von CS_2 in der Leberzelle niedergelegt. FREUNDT (1972) hat bei Ratten festgestellt, daß das Agens während einer CS_2-Exposition in die stark Lipoprotein-haltigen Lebermikrosomen eindringt und aus diesen nach Expositionsende innerhalb von 12 Std. rasch verschwindet ($t\ ^1/_2$ für Gesamtleber und Lebermikrosomen sind fast identisch). Unsere Befunde bestätigen erstere Beobachtung. Darüber hinaus geht aus unseren Resultaten hervor, daß rund 40 % des in die Leber eingedrungenen Schwefelkohlenstoffes im Zellkern, in der Zellwand sowie in einigen großen Zellorganellen (Mitochondrien u.a.) vorliegen. Rund 20 bis 30 % werden vom endoplasmatischen Retikulum aufgenommen. Gleich hoch liegt der Anteil für die lösliche Zellphase (Cytoplasma). Die relativ hohe Anhäufung des mikrosomalen Pellets mit dem lipophilen CS_2 ist auf seinen hohen Gehalt an Lipoproteinen zurückzuführen. Da wir weiter gefunden haben, daß innerhalb von 4 Std. rund 1 % der applizierten CS_2-Menge von der Leber aufgenommen wird, ist abzuleiten, daß etwa 0,25 % des in den Körper gelangten CS_2 in das endoplasmatische Retikulum, d.i. der Ort des oxydativen Fremdstoffumsatzes, eindringt. Diese Bilanzierung ergänzt die in der Literatur niedergelegten Daten über die Pharmakokinetik des CS_2.

Wir haben festgestellt, daß die Ratte nach s.c. Gabe von $^{14}CS_2$ innerhalb von 4 Std. ungefähr 10 % der Aktivität abatmet. Diese Größenordnung stimmt in etwa mit den Angaben von STRITTMATTER et al. (1950) überein, die bei Mäusen nach intraperitonealer $C^{35}S_2$-Anwendung 18 % der Aktivität in der Ausatmungsluft wiederfanden.

5.2. ^{3}H-Phenylalanin-Einbau in Rattenleber-Mikrosomen

Untersuchungen über den Mechanismus der Hemmung mikrosomaler Enzyme durch CS_2 haben einige Fakten erbracht, die den Verdacht aufkommen lassen könnten, daß CS_2 auch induktiv auf das endoplas-

matische Retikulum der Leber wirkt.

KÜRZINGER und FREUNDT (1969) fanden bei Ratten, daß eine 8-stündige Exponierung in 20 bis 400 ppm CS_2 einen dosisunabhängigen Anstieg des Gesamtleberproteins um rund 15 % hervorruft. Gleichsinnig verhält sich das mikrosomale Protein: Dieses vermehrt sich ebenfalls von der CS_2-Dosis unabhängig um ungefähr 30 %, wie KROMER und FREUNDT (1970) feststellten. Darüber hinaus steigen die mikrosomalen Gesamt-Lipide unter gleicher CS_2-Vorbehandlung jedoch dosisabhängig stark an (FREUNDT und SCHAUENBURG 1971). Solche Veränderungen werden auch bei der Induktion durch Phenobarbital oder 3-Methylcholantren in der Rattenleber gefunden (ARCOS et al. 1961, CONNEY et al. 1960, CONNEY und GILMAN 1963, ORRENIUS et al. 1965, u.a.). Gleichzeitig verursachen Induktorstoffe eine Lebervergrößerung (ARCOS et al. 1961). Inhalierter Schwefelkohlenstoff ruft hingegen eine geringgradige dosisabhängige Verringerung des relativen Lebergewichtes hervor (KÜRZINGER und FREUNDT 1969). Dieser Tatbestand ist mit der Annahme einer induktiven CS_2-Wirkung schwer vereinbar. Gegen eine solche Annahme spricht ausserdem, daß eine fünfmalige CS_2-Exponierung in Tagesabständen bei männlichen Versuchspersonen keine Beschleunigung des Aminophenazonabbaus verursachte (MACK und FREUNDT 1971).

Wie wir gezeigt haben, wird die Aminosäure ^{3}H-Phenylalanin vermehrt, von der CS_2-Dosis abhängig, in die Mikrosomenfraktion eingebaut (maximal 26 %). Dieses Verhalten korreliert gut mit früheren Beobachtungen des hiesigen Arbeitskreises, wonach gleiche CS_2-Dosen das mikrosomale Protein vermehren.

Das gleiche Phänomen wird auch durch Induktorstoffe, jedoch in weit stärkerem Maße, ausgelöst. Phenobarbitalvorbehandlung steigert die ^{14}C-Leucin-Inkorporation in Rattenlebermikrosomen in vivo um 25 % (KATO et al. 1965) und in vitro um 163 % (GELBOIN und SOKOLOFF 1961 und 1964); 3-Methylcholanthren vermehrte den ^{14}C-Leucin-Einbau in mikrosomales Protein in vitro um 22 % (DECKEN und HULTIN 1960) bzw. 60 % (GELBOIN und SOKOLOFF 1961, 1964).

Dieses ähnliche Verhalten von CS_2 und Induktoren (Phenobarbital, 3-Methylcholanthren) alleine läßt jedoch noch nicht den Schluß

zu, daß CS_2 eine echte induktive Wirkung auf das endoplasmatische Retikulum der Leber hat. Es fehlt der Nachweis einer Aktivitätssteigerung mikrosomaler Enzyme durch CS_2. Wir deuten die vermehrte ^{3}H-Phenylalanin-Inkorporation im Verein mit dem geringen Anstieg des mikrosomalen Proteins und des Gesamt-Leberproteins zunächst als eine unspezifische Reaktion der Leberzelle, zu deren Erklärung noch weitere Untersuchungen über die CS_2-Wirkung auf die Proteinsynthese erforderlich sind.

Auch BOND und DE MATTEIS (1969) fanden bei Ratten 24 Std. nach einer einmaligen peroralen Gabe von 1 ml CS_2/kg (!) einen Anstieg des Gesamtproteins der Leber um ungefähr 20 %, der von einer um 25 % vermehrten ^{14}C-Leucin-Inkorporation (in das Gesamt-Leberprotein!) begleitet war.

Gewöhnlich geht jedoch die durch ein Agens verursachte Vermehrung der mikrosomalen Proteine mit einer Steigerung der mischfunktionellen Enzymaktivität einher. Schwefelkohlenstoff bewirkt eine solche simultane Reaktion jedoch nicht. BOND und DE MATTEIS (1969) erklärten diese Diskrepanz durch eine Entleerung des freien Aminosäurepools. Ein solcher Vorgang wäre deshalb denkbar, da CS_2 mit Aminosäuren in vivo reagieren kann, wobei Stoffe vom Typ der Dithiocarbaminocarbonsäuren entstehen (SOUČEK et al. 1956). Die frei gewordenen Aminosäurespeicherstellen könnten dann durch die angebotene markierte Aminosäure (bei BOND und DE MATTEIS 1969 ^{14}C-Leucin, in unserem Falle ^{3}H-Phenylalanin) besetzt werden; hieraus würde eine vermehrte "Inkorporation" meßbar resultieren. Wir können uns einer solchen Deutung jedoch deshalb nicht anschließen, da nach unseren Befunden ein vermehrter ^{3}H-Phenylalanin-Einbau ausschließlich in den Mikrosomen erfolgt, und die anderen proteinhaltigen Zellelemente unbeeinflußt bleiben. Unseres Erachtens erlagen BOND und DE MATTEIS (1969) deshalb einem Trugschluß, da sie ihrer Betrachtung das Ergebnis der vermehrten Inkorporation von ^{14}C-Leucin in das Gesamt-Leberprotein zugrundelegten und keine Zellfraktionierungen vornahmen.

Wenn auch nach dem gegenwärtigen Stand der Kenntnisse noch keine Entscheidung gefällt werden kann, ob der CS_2 neben einer Hemmung mischfunktioneller Oxydasen dieselben auch stimulieren kann, so würde im positiven Falle ein solcher dualistischer Modus nicht

überraschen. Beide Prinzipien sind nämlich simultan und interferierend beispielsweise auch dem Äthanol (SCHÜPPEL 1969, KALANT et al. 1970), dem SKF 525-A (ANDERS und MANNERING 1966), dem Piperonylbutoxid (JAFFE et al. 1969) oder dem Aceton (TAGG und MITOMA 1968, ANDERS 1968) zu eigen. Nehmen wir solch ein Verhalten an, so würde der eigentliche Inhibitoreffekt des CS_2 auf mikrosomale Enzyme wesentlich stärker veranschlagt werden müssen als er in Wirklichkeit in Erscheinung tritt.

Vergleicht man die bisher bekannt gewordenen Inhibitorstoffe (Übersicht bei FREUNDT 1972) mit dem CS_2, so fällt ein Individuum auf, das in der Art seiner Wirkung auf Lebermikrosomen dem CS_2 nahe steht. Es handelt sich um das Pyrithioxin (Pyridoxin-5-disulfid-2 HCl · 2 H_2O), ein Vitamin B_6-Derivat. ENDO und UCHIYAMA (1970) fanden, daß diese Substanz mikrosomale Oxydationen in der Leber stark hemmt ohne den Gehalt an Cytochrom P-450 zu ändern, was auch für den CS_2 zutrifft (FREUNDT und SCHAUENBURG 1971). Außerdem verursacht auch Pyrithioxin einen vermehrten Einbau von ^{14}C-Aminosäuren in die Lebermikrosomen.

Abweichend von BOND und DE MATTEIS (1969) fanden wir keinen vermehrten Aminosäure-Einbau in das Rattenserum unter CS_2-Einfluß. Da obige Autoren nur eine leichte nichtsignifikante Einbausteigerung beobachteten, erklären wir die Diskrepanz zwischen ihrem und unserem Ergebnis zunächst durch die weit differierende CS_2-Dosis. Möglicherweise sind noch zusätzliche methodische Abweichungen verantwortlich zu machen.

Daß die CS_2-bedingte Steigerung des ^{3}H-Phenylalanin-Einbaus in die Mikrosomen mit der Hemmung ihrer Enzymaktivität in Zusammenhang steht, ist auch an der raschen Reversibilität dieser Änderung erkenntlich. Sowohl die Störung der oxydativen mikrosomalen Leistung, wie alle biochemischen Veränderungen an den Lebermikrosomen (Proteingehalt, Lipidbestand u.a.) sind eng an die Anwesenheit des CS_2 im endoplasmatischen Retikulum der Leber gebunden (FREUNDT und SCHNAPP 1970).

5.3. Ausblicke

Zur Aufklärung der Natur der gesteigerten Proteinsynthese im endoplasmatischen Retikulum der Leber werden weitere Versuche er-

forderlich sein. Hierbei werden zunächst die Schritte der Proteinsynthese in der Leberzelle und in den endoplasmatischen Membranen sowie ihre Regulationsmechanismen näher geprüft werden müssen. Durch den Einsatz von Actinomycin D (GELBOIN 1964), das die Synthese von m-RNS hemmt, sollte es möglich sein, einen fraglichen Einfluß von CS_2 auf die RNS-Synthese zu klären. In einem weiteren Versuchsansatz sollte geprüft werden, ob das Agens bestimmte Löslichkeitsfaktoren stört, die bei der Bindung von Aminosäuren an die RNS bedeutsam sind. Hierbei würde sich die Anwendung von RNS-^{14}C-Leucin oder RNS-^{14}C-Prolin nach GELBOIN und SOKOLOFF (1961) anbieten. Auch wird der Bestand an GTP, dem eine Rolle bei der Verwertung der löslichen RNS-Aminosäure-Verbindungen und damit beim Aufbau mikrosomaler Proteine zukommt, im Leber-Supernatant von Versuchstieren, die mit CS_2 vorbehandelt sind, überprüft werden müssen; Induktorstoffe können diesen nämlich steigern (GELBOIN und SOKOLOFF 1964).

6. Anhang

6.1. Linearitätsbereich für Scintillationsmessungen

Zur Überprüfung des Linearitätsbereiches werden Meßproben bereitet, deren Aktivitäten zwischen $3 \cdot 10^6$ - $50 \cdot 10^6$ Cpm (TOH) liegen, und im Flüssigkeitsscintillations-Zähler gemessen. Wie Abb. 8 zeigt, steigt die Impulsrate bis zu $8 \cdot 10^6$ Zpm je Probe linear an. Bei den vorliegenden Untersuchungen wird nur innerhalb dieses Linearitätsbereiches gemessen.

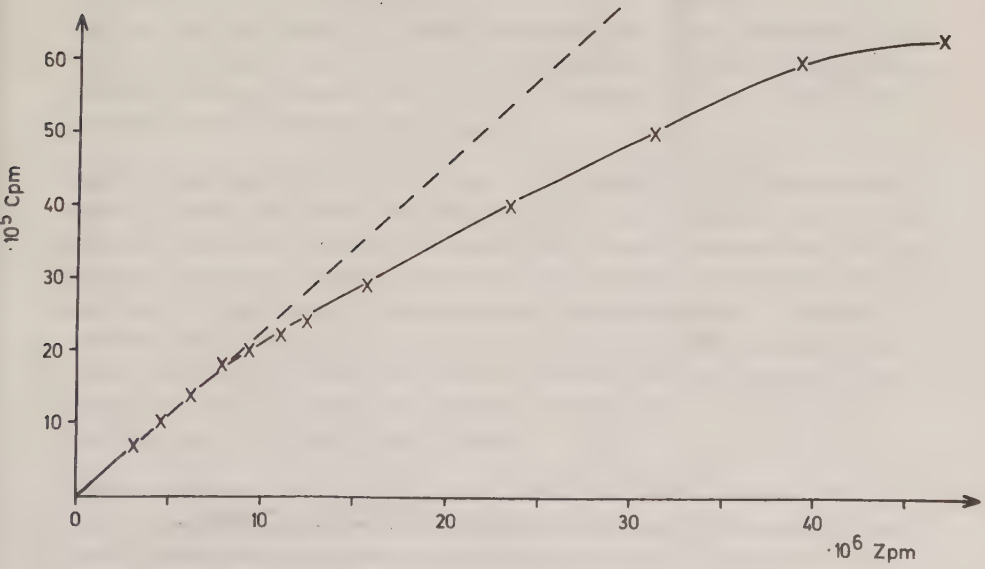

Abb. 8 - Impulsrate in Abhängigkeit zur Aktivität.
Bis zu $8 \cdot 10^6$ Zpm steigt die Impulsrate linear an.
Messungen mit Flüssigkeitsscintillations-Zähler (Tri-Carb Modell 3380), POPOP-Medium + 0,1 ml TOH.

c.2. Chemolumineszenz von Meßproben, die Instagel und Soluene(R) enthalten (Soluene(R)-bedingte Chemolumineszenz von Instagel)

Bei der gleichzeitigen Verwendung von Instagel und Soluene(R) zur Bereitung der Meßproben werden unverständlich hohe Impulsraten im Flüssigkeitsscintillations-Zähler registriert. Es zeigt sich, daß Soluene(R) zu einer langsam absinkenden Chemolumineszenz im Instagel führt. Zur Überprüfung des Phänomens wird zu 10 ml Instagel 1 ml Soluene(R) gegeben und die ohne Anwesenheit von entsprechenden radioaktiven Verbindungen entstehenden Lichtblitze fortlaufend gemessen (Abb. 9). Dieser Effekt läßt sich durch Neonlicht verstärken.

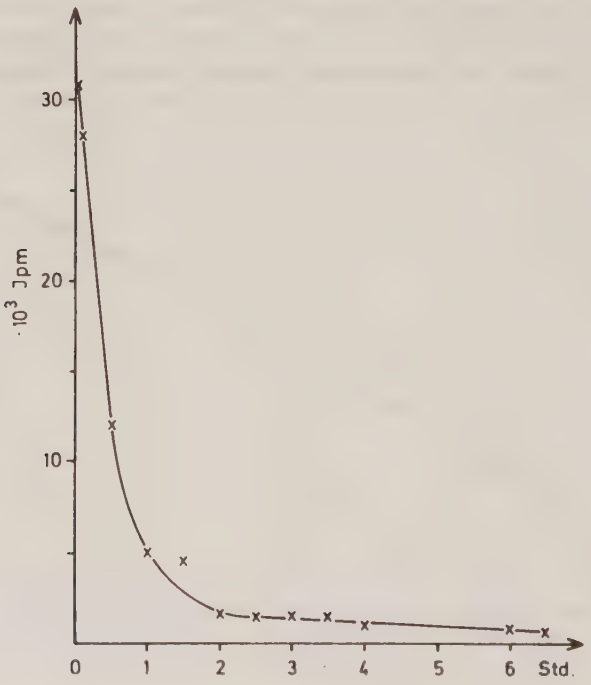

Abb. 9 - Zeitliches Verhalten der beim Mischen von Instagel und Soluene(R) (10 + 1 ml) entstehenden Chemolumineszenz (Messung einer inaktiven Probe im Flüssigkeitsscintillations-Zähler).

7. Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, Beiträge zum Mechanismus der Hemmwirkung von Schwefelkohlenstoff auf mischfunktionelle Leberoxydasen zu liefern.

Zur Bestimmung der Verteilung und Elimination von $^{14}CS_2$ in Ratten wurde eine Methode entwickelt. Folgende Daten wurden über den Verbleib von markiertem CS_2 erhoben:

Wird $^{14}CS_2$ in physiol. NaCl-Lösung Ratten subcutan verabreicht, so baut sich im Blut innerhalb von 30 min ein über 2 1/2 Std annähernd gleichbleibender ^{14}C-Spiegel auf; dieser sinkt dann ab. Zwischen 4,5 und 13,1 % der applizierten Aktivität werden innerhalb von 4 Std abgeatmet; anschließend werden 1 % in der Leber gefunden, während rund 90 % im hepatektomierten Tier verbleiben.

Ungefähr 60 % der in der Leber erscheinenden Aktivität entfallen auf den bei 9000 x g-Zentrifugation des Organhomogenats gewonnenen Überstand, der Rest auf das Sediment. Die Aktivitätsanteile sind im Supernatant und in den Mikrosomen des bei 78000 x g fraktionierten Überstandes gleich.

Zur Bestimmung der Inkorporation von ^{3}H markiertem Phenylalanin in die Leber und Serum von Ratten wurde ein Verfahren ausgearbeitet. CS_2 wirkt auf den Einbau einer tritierten Aminosäure in folgender Weise ein: Exponierungen in 200 bzw. 400 ppm CS_2/8 Std rufen eine Steigerung des Einbaus von ^{3}H-Phenylalanin in Lebermikrosomen um 12 bzw. 26 % hervor. Dieser Effekt ist nach 52 Std nicht mehr nachweisbar. Der Einbau in die übrigen Leberzellfraktionen (9000 x g-Sediment, 78000 x g-Überstand) und in Serum bleiben nach CS_2-Einwirkung normal.

Dieses Ergebnis stimmt mit einem früher erhobenen Befund überein, wonach CS_2-Inhalation eine Vermehrung des mikrosomalen Proteins verursacht, und deutet darauf hin, daß das Agens die Proteinsynthese im endoplasmatischen Retikulum stimuliert.

Den Herren Professoren Dr. D. Henschler und Dr. W. Maurer danke ich für die Arbeitsmöglichkeit an ihren Instituten und die großzügige Unterstützung der Arbeit. Herrn Professor Dr. Henschler bin ich für die Überlassung des Themas und die Übernahme des Referates zu besonderem Dank verpflichtet.

Den Herren Dr. K.J. Freundt und Priv.-Doz. Dr.Dr. K. Hempel danke ich für die Unterstützung bei Ausführung und Abfassung der Arbeit. Herrn Priv.-Doz. Dr.Dr. Hempel danke ich auch herzlich für die Übernahme des Korreferates.

8. Literaturverzeichnis

ANDERS, M.W., G.J. MANNERING: Mol. Pharmacol. 2, 341 (1966)

ANDERS, M.W.: Arch. Biochem. Biophys. 126, 269 (1968)

ARCOS, J.S., A.H. CONNEY, N.P. BUU-HOI: J. biol. Chem. 236, 1291 (1961)

BAADER, E.W. (Hrg.): Handbuch der gesamten Arbeitsmedizin, II. Bd, 1. Teilbd., S. 313, Urban u. Schwarzenberg, Berlin 1961

BARTONÍČEK, V.: Pracov. lék. 10, 334 (1958)

BOBSIEN, K.: Arch. Gewerbepath. -hyg. 13, 193 (1954)

BOND, E.J., F. DE MATTEIS: Biochem. Pharmakol. 18, 2531 (1969)

BOND, E.J., W.H. BUTLER, F. DE MATTEIS, J.M. BARNES: Brit. J. industr. Med. 26, 335 (1969)

BRIEGER, H., J. TEISINGER (Hrg.): Toxicology of Carbon Disulfide. Excerpta Medica Foundation, Amsterdam 1967

BROWNING, E.: Toxicity and Metabolism of Industrial Solvents, Elsevier Publ. Comp., Amsterdam 1965

BÜSING, K.-H., A. BOHLÄNDER: Arch. Hyg. 136, 468 (1952)

BÜSING, K.-H., W. SONNENSCHEIN, E.W. BECKER, H. DREIHELLER: Z. Naturforsch. 8b, 495 (1953)

CHERVENKA, C.H., P.E. WILCOX: J. biol. Chem. 222, 621 (1956)

CONNEY, A.H., C. DAVISON, R. GASTEL, J.J. BURNS: J. Pharmacol. exp. Ther. 130, 1 (1960)

CONNEY, A.H., A.G. GILMAN: J. biol. Chem. 238, 3682 (1963)

DECKEN, A., T. von der HULTIN: Arch. Biochem. Biophys. 90, 201 (1960)

DEMUS, H.: Faserforsch. Textiltechn. 4, 22 (1953)

DEMUS, H.: Intern. Arch. Gewerbepath. 20, 507 (1964)

ENDO, Y., M. UCHIYAMA: Biochem. Pharmacol. 19, 2839 (1970)

FREUNDT, K.J., W. DREHER: Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. 263, 208 (1969)

FREUNDT, K.J., P. KUTTNER: Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. 264, 232 (1969)

FREUNDT, K.J., E. SCHNAPP: Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. 266, 324 (1970)

FREUNDT, K.J., K. SCHAUENBURG: Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol. Suppl. 270, R 35 (1971)

FREUNDT, K.J.: Habil.-Schrift, Med. Fak. Univ. Würzburg 1972

GEIGER, E.: Textil-Rundschau 7, 185 (1952)

GELBOIN, H.V., L. SOKOLOFF: Science 134, 611 (1961)

GELBOIN, H.V., L. SOKOLOFF: Biochim. biophys. Acta (Amst.) 91, 122 (1964)

GELBOIN, H.V.: Biochim. biophys. Acta (Amst.) 91, 130 (1964)

GORNALL, A.G., C.J. BARDAWILL, M.M. DAVID: J. biol. Chem. 177, 751 (1949)

HENSCHLER, D., K.J. FREUNDT: II. Intern. Symp. on Toxicol. of Carbon Disulfide, 25th - 28th May 1971, Banja Koviljača/Yugoslavia. Abstracts

JAFFE, H., K. FUJII, H. GUERIN, M. SENGUPTA, S.S. EPSTEIN: Biochem. Pharmacol. 18, 1045 (1969)

KALANT, H., J.M. KHANNA, J. MARSHMAN: J. Pharmacol. 175, 318 (1970)

KALBERER, F., J. RUTSCHMANN: Helv. Chim. Acta 64, 1956 (1961)

KATO, R., L. LOEB, H.V. GELBOIN: Biochem. Pharmacol. 14, 1164 (1965)

KREJČÍ, F., Z. MÁDLO: Pracov. lék. 3, 124 (1951)

KROMER, W., K.J. FREUNDT: Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmakol. 266, 381 (1970)

KÜRZINGER, R., K.J. FREUNDT: Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmakol. 264, 261 (1969)

LEONIS, J.: C.R. Trav. Labor. Carlsberg. Sér. chim. 26, 315 (1948)

LEVY, A.L.: J. Chem. Soc. 1950, 404

LYSINA, G.G. in BRIEGER, H., J. TEISINER (1967)

MACK, Th., K.J. FREUNDT: Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmakol. Suppl. Vol. 270, R 93 (1971)

MÁDLO, Z., B. SOUČEK: Arch. Gewerbepath., -hyg. 14, 554 (1956)

MASSMANN, W., K. STRENGE: Arch. Toxikol. 16, 58 (1956/57)

McKEE, R.W., C. KIPER, J.H. FOUNTAIN, A.M. RISKIN, P. DRINKER: J. Am. Med. Assoc. 122, 217 (1943)

MOESCHLIN, S.: Klinik und Therapie der Vergiftungen, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1964

MUNRO, H.N., A. FLECK: Analyst 91, 78 (1966)

NESSWETHA, W.: Arch. Gewerbepath., -hyg. 14, 522 (1956)

ORRENIUS, S., L. ERNSTER: J. Cell. Biol. 25, 627 (1965)

PEGAL, M., N. VUKOJEVIĆ, N. CÍRIN-POPOV, D. DJURIĆ, T. BOJOVIĆ: II. Int. Symp. on Toxicology of Carbon Disulfide, 25th - 28th May 1971. Banja Koviljača/Yugoslavia. Abstracts (a)

PEGAL, M., N. VUKOJEVIĆ, D. DJURIĆ, T. BOJOVIĆ: II. Int. Symp. on Toxicology of Carbon Disulfide, 25th - 28th May 1971. Banja Koviljača/Yugoslavia. Abstracts (b)

PICOLLI, P., G. ROZERA: Folia med. 41, 991 (1958)

von RECHENBERG, H.K.: Arch. Gewerbepath. - hyg. 15, 487 (1957)

SCHEEL, L.D., R. KILLENS: Proc. 13th Intern. Congr. Occup. Health 1960; S. 783

SCHEEL, L.D.: Am. industr. Hyg. Ass. J. 26, 585 (1965)

SCHÜPPEL, R.: Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmakol. 265, 156 (1969)

SIEKEWITZ, P.: J. biol. Chem. 195, 553 (1962)

SOUČEK, B., Z. MÁDLO: Pracov. lék. 5, 309 (1953)

SOUČEK, B., Z. MÁDLO: Pracov. lék. 6, 11 (1954)

SOUČEK, B., Z. MÁDLO: Bull. Soc. Chim. Biol. Paris 37, 1373 (1955)

SOUČEK, B., Z. MÁDLO: Arch. Gewerbepath., -hyg. 14, 511 (1956)

SOUČEK, B., Z. MÁDLO, H. HOLEYSOVSKÁ: Arch. Gewerbepath., -hyg. 15, 531 (1957)

SOUČEK, B.: J. Hyg. Epidem. Microbiol. Immun. (Praha) 1, 10 (1957)

STRITTMATTER, C.F., T. PETERS, R.W. McKEE: Arch. industr. Hyg. Occup. Med. 1, 54 (1950)

TAGG, J., Ch. MITOMA: Biochem. Pharmacol. 17, 2471 (1968)

THER, L.: Grundlagen der experimentellen Arzneimittelforschung, Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft m.b.H., Stuttgart 1965

TOYAMA, T., H. SAKURAI in BRIEGER, H., J. TEISINGER (1967)

VIGLIANI, E.C.: in E.W. BAADER (Hrg.)

VIGLIANI, E.C., B. PERNIS: Arch. Gewerbepath., -hyg. 14, 190 (1955)

VOGEL, A.J.: A Text-Book of Practical Organic Chemistry Including Qualitative Organic Analysis, 3rd edition 1957, Long., Green and Co. Ltd., London

WIRTH, W., G. HECHT, Chr. GLOXHUBER: Toxikologie Fibel, Georg Thieme Verlag, 2. Aufl., Stuttgart 1971

YOSHIDA, K.: J. Sci. Labour (Tokyo) 31, 209 (1955)

ZAHRADNÍK, R.: Chem. listy 50, 1885 (1956) a

ZAHRADNÍK, R.: Chem. listy 50, 1892 (1956) b

ZAHRADNÍK, R.: Chem. Techn. 11, 546 (1959)

L e b e n s l a u f

Am 10. März 1941 wurde ich als drittes Kind des Zahnarztes Dr.med. univ. Erwin Eichhorn und seiner Ehefrau Elisabeth, geb. Brochmann, in Bielitz/OS geboren. Nach der Vertreibung 1945 übersiedelten wir nach Gelchsheim/Krs. Ochsenfurt. Dort besuchte ich von 1947 bis 1951 die Volksschule. 1960 bestand ich an der Oberrealschule Marktbreit das Abitur. Im Wintersemester 1960/61 begann ich an der Universität Würzburg das Studium der Zahnmedizin und legte 1965 die zahnärztliche Vorprüfung , 1968 das Staatsexamen ab. Anschließend war ich in einer zahnärztlichen Praxis tätig bis ich im Oktober 1969 zum Wehrdienst eingezogen wurde. Vom 15. April 1970 - 31. August 1971 arbeitete ich als wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg. Seit 1. September 1971 bin ich wieder als Zahnarzt in der freien Praxis tätig.

Hr. F. Eichhorn

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80